断奶时间对不同日龄湖羊羔羊瘤胃形态及表皮生长相关基因表达的影响

刘 婷[1] 李发弟[1*] 李 冲[1,2] 王维民[1,2] 汪晓娟[1] 李 飞[3] 郑 琛[1] 莫负涛[1]
王芳彬[1] 喇永富[1] 李宝胜[4]
（1.甘肃农业大学动物科学技术学院，兰州 730070；2.甘肃省肉羊繁育生物技术工程实验室，民勤 733300；3.兰州大学草地农业科技学院，兰州 730020；4.甘肃金昌中天羊业有限公司，金昌 737100）

摘 要：本试验旨在探讨断奶时间对不同日龄湖羊羔羊瘤胃形态及表皮生长相关基因表达的影响。采用两因子试验设计，设断奶时间和羔羊日龄 2 个因子。选择初生重[（3.51±0.57） kg]接近的 54 只湖羊羔羊，28 日龄时随机屠宰 6 只后按照同质性原则将剩余 48 只湖羊分为 28 日龄断奶组[（8.21±0.97） kg]和 56 日龄断奶组[（8.06±0.53） kg]，分别在 42、56、70 和 84 日龄从 2 组中各随机挑选 6 只羔羊进行屠宰。采集瘤胃腹囊组织样品测定瘤胃乳头长度、宽度和肌层厚度，提取瘤胃组织总 RNA 测定表皮生长相关基因表达量。结果表明：28 日龄断奶组羔羊瘤胃乳头长度和宽度显著高于 56 日龄断奶组羔羊（$P<0.05$），瘤胃肌层厚度显著低于 56 日龄断奶组羔羊（$P<0.05$）。断奶时间和羔羊日龄之间的交互作用对瘤胃乳头长度和肌层厚度有显著影响（$P<0.05$）。28 日龄断奶组羔羊瘤胃上皮胰岛素样生长因子结合蛋白（*IGFBP*）3、*IGFBP*5 和 *IGFBP*6 表达量显著高于 56 日龄断奶组（$P<0.05$）。羔羊瘤胃乳头长度与转化生长因子 β（*TGFβ*）1 和 *IGFBP*6 表达量呈显著负相关（R=-0.318，P=0.001；R=-0.520，P<0.001）；瘤胃乳头宽度与 *TGFβ*1 表达量呈显著负相关（R=-0.275，P=0.004），与 *IGFBP*3 和 *IGFBP*5 表达量呈显著正相关（R=0.344，P<0.001；R=0.256，P=0.001）。综上所述，28 日龄断奶促进湖羊羔羊瘤胃乳头发育，瘤胃表皮生长相关基因,可能参与羔羊瘤胃早期发育的调控。

关键词：湖羊羔羊；早期断奶；瘤胃形态学；发育；基因表达
中图分类号：S826

羔羊生长发育过程中瘤胃发育是一个重要的环节，断奶后瘤胃内发酵类型的改变，将

收稿日期：2016-01-12
基金项目：国家自然科学基金（31260564）；国家现代肉羊产业技术体系（CARS-39）
作者简介：刘 婷（1985—），女，陕西临潼人，博士研究生，从事反刍动物营养研究。E-mail：lting822@sina.cn
*通信作者：李发弟，教授，博士生导师，E-mail：lifd@lzu.edu.cn

难以消化的纤维类物质降解为最终产物挥发性脂肪酸，瘤胃上皮对于挥发性脂肪酸的吸收转运很大程度取决于角质层厚度。研究表明，高营养水平饲粮可通过增加上皮基底层细胞数量和提高细胞分化迁移率，引起棘状细胞层和颗粒层细胞数量增加，促进瘤胃上皮的发育[1]。瘤胃上皮细胞在胎儿期开始分化，直到出生时，分化仍未完成。出生时，可利用显微镜在瘤胃上皮观察到瘤胃乳头，随着年龄增长和饲料的影响，瘤胃乳头的面积、长度和宽度逐渐增加[2]。幼龄反刍动物瘤胃的发育与采食饲料类型直接相关。犊牛只采食牛奶时，其瘤胃乳头并不发育；牛奶和饲草共同饲喂对瘤胃乳头发育起不到有效的刺激作用[3]。此外，Žitňan等[4]试验表明,早期断奶犊牛乳头的表面积大于常规饲养犊牛，但Klein等[5]使用2种不同的断奶体系,却并未发现与Žitňan等[4]相似的结果。本试验对早期饲喂开食料断奶时间不同的湖羊羔羊瘤胃形态发育展开研究，并揭示瘤胃乳头发育相关基因与湖羊羔羊瘤胃发育之间关系，为羔羊早期断奶及补饲提供理论依据。

1. 材料与方法

1.1 试验动物及试验设计

试验采用两因子试验设计，设断奶时间和羔羊日龄 2 个因子。试验动物购于甘肃金昌中天羊业有限公司，选取初生重[（3.51±0.57） kg]接近的 54 只湖羊双羔饲养至 28 d，随机屠宰 6 只（8.22±0.87 kg）后按同质性原则将剩余 48 只湖羊分为 28 日龄断奶组[（8.21±0.97） kg]和 56 日龄断奶组[（8.06±0.53） kg]。28 日龄断奶组在分组当天断奶，56 日龄断奶组在 56 日龄断奶。

1.2 试验饲粮及饲养管理

所有羔羊都从 7 日龄开始补饲开食料 1，60 日龄逐渐更换开食料 2，过渡期 10 d。开食料压缩比均为 1︰6，制粒直径均为 2.5 mm。饲粮中干物质（DM）、粗蛋白质（CP）、中性洗涤纤维（NDF）和钙（Ca）和磷（P）含量测定参照《AOAC 分析方法手册》[6]及《饲料分析及饲料质量检测技术》[7]。消化能和淀粉含量计算参照文献[8-9]，开食料各个组成原料的绵羊消化能和淀粉含量，乘以开食料中各个原料的组成比例后，求出它们之和。开食料组成及营养水平见表 1，开食料 1 和开食料 2 的精粗比分别为 78:22、57:43。

表 1 开食料组成及营养水平(风干基础)

Table 1 Composition and nutrient levels of starters (air-dry basis) %

原料 Ingredients	开食料 1 Starter 1	开食料 2 Starter 2

苜蓿 Alfalfa hay	5.00	25.00
玉米 Corn	55.90	44.50
大豆粕 Soybean meal	11.00	9.00
乳清粉 Whey powder	1.50	
膨化大豆 Expended soybean	7.00	
干麦芽根 Dried malt root	17.00	18.00
石粉 Limestone	1.20	0.70
预混料 Premix[1)]	1.00	1.00
食盐 NaCl	0.30	0.40
香味剂 Feed attractant	0.10	
小苏打 $NaHCO_3$		1.40
合计 Total	100.00	100.00
营养水平 Nutrient levels[2)]		
干物质 DM	87.48	87.61
粗蛋白质 CP	18.15	14.64
消化能 DE/(MJ/kg)	13.50	12.07
中性洗涤纤维 NDF	18.00	22.00
粗饲料来源中性洗涤纤维 FNDF	8.83	9.20
淀粉 Starch	38.81	28.93
钙 Ca	0.67	0.70
磷 P	0.32	0.35

[1)] 预混料为每千克饲粮提供 The premix provided the following per kg of diets：Fe 25 mg，Zn 40 mg，Cu 8 mg，Mn 40 mg，I 0.3 mg，Se 0.2 mg，Co 0.1 mg，VA 940 IU，VD 111 IU，VE 20 IU。

[2)] 干物质、粗蛋白质、中性洗涤纤维、钙和磷为实测值，其他为计算值。DM， CP， NDF， Ca and P were measured values， while the others were calculated values.

羔羊与母羊共同饲养在同一圈栏内，圈栏内安有补饲栏。每天 08:00—10:00、12:00—14:00、18:00—20:00 将羔羊关进补饲栏，使其与母羊隔开，母羊采食饲料。母羊料为常规全混合日粮（TMR）（原料为青贮玉米 40%、燕麦草 12%、苜蓿 10%、大麦秸秆 8%、油菜秸秆 5%、豆渣 13%、玉米 9%、豆粕 3%，营养水平为消化能 7.38 MJ/kg，粗蛋白质 7.60%，钙 0.32%，磷 0.25%）。母羊采食 TMR 后，将饲槽和圈舍清扫干净，避免羔羊跟随母羊时采食母羊料，其余时间羔羊可跟随母羊自由吮乳。圈舍每隔 15 d 彻底消毒 1 次。表 2 为 28 日龄断奶组和 56 日龄断奶组羔羊不同日龄阶段日均干物质采食量。由于羔羊随母羊群饲，数据未进行统计分析。

表 2　湖羊羔羊不同日龄阶段日均干物质采食量

Table 2　Average daily DM intake of lambs at different days of age　　g/d

日龄 Days of age	28 日龄断奶组 28 days of age weaner group	56 日龄断奶组 56 days of age weaner group
28~42	205.05	152.59
43~56	474.25	333.83

57~70	643.62	569.03
71~84	1 008.33	1 156.41

1.3 样品采集

试验羔羊分别于 28、42、56、70 和 84 日龄屠宰采样，每组在每个时间点随机屠宰 6 只羔羊。屠宰后迅速采集瘤胃腹囊右侧上皮组织 5 块，每块大小约为 2 cm×2 cm×2 cm，用预冷的生理盐水冲洗干净后立即放入 2.0 mL Eppendorf 管，投入液氮速冻，后放入-80 ℃备用。采集瘤胃腹囊上皮组织，用预冷的磷酸盐缓冲液(PBS，pH=7.4，1×)反复冲洗后，立即放入 4%甲醛溶液固定。将瘤胃内容物用 4 层纱布过滤，滤液装入 5mL Eppendorf 管，投入液氮速冻，后放入-80 ℃备用。

1.4 主要仪器与试剂

显微镜（IX71，日本 Olympus 公司），实时定量 PCR 仪（CFX96，美国 Bio-Rad 公司），微量紫外可见分光光度计（NANODrop2000，德国 Thermo 公司），电泳仪(PowerPac™，美国 Bio-Rad 公司)、凝胶成像仪（GelDoc-It310，美国 UVP 公司）,气象色谱仪（Focus GC AI 3000，德国 Thermo 公司）。

Trizol、反转录试剂盒、SYBR Green PCR Master Mix 均购自北京全式金生物技术有限公司。

1.5 试验方法

1.5.1 总 RNA 提取

按照 Trizol 的使用说明提取瘤胃腹囊上皮组织总 RNA。用微量紫外可见分光光度计测定总 RNA 浓度和纯度，并用 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的质量。

1.5.2 实时定量 PCR

参照TransScript One-Step gDNA Removal and cDNA Sythesis Super Mix试剂盒说明书中选择一种方法进行反转录（RT）。应用引物设计软件Primer5设计引物，以甘油酸-3-磷酸脱氢酶(*GAPDH*)为内参基因，使用20 μL的扩增体系：10 μL SYBR Premix Ex Taq Ⅱ，0.4 μL上游引物（10 μmol/L）和0.4 μL下游引物（10 μmol/L）(表3)，1 μL cDNA，8.2 μL ddH_2O，混合样品。扩增条件为：95 ℃预变性2 min；95 ℃变性10 s，退火20 s，72 ℃延伸10 s，读板2次，40个循环，72 ℃延伸5 min；熔解曲线条件为：60~95 ℃，每隔0.05 s读板1次；阴性对照用1 μL ddH_2O代替模板。试验对每个样品检测进行4个技术重复。

表3　基因引物序列及参数

Table 3　Sequences and parameters of gene primers

基因 Genes	引物序列 Primer sequences （5´-3´）	产物大小 Product size/bp	退火温度 Tm/℃
转化生长因子β1 *TGFβ*1	F:TGACCCACAGAGAGGAAATAGA R:AACCCGTTGATGTCCACTTGAA	94	57
胰岛素样生长因子结合蛋白3 *IGFBP*3	F:TCAGCCTTGCGGCGTCTA R:TGTGGGCGAGGTGGGATT	275	60
胰岛素样生长因子结合蛋白5 *IGFBP*5	F:GCTGAAGGCTGAGGCTGTGAA R:TCCCATACTTGTCCACGCACC	308	57
胰岛素样生长因子结合蛋白6 *IGFBP*6	F:AGAGTAAGCCCCAAGCAG R:CACGGAGTCCAGATGTTT	159	59
甘油醛-3-磷酸脱氢酶 *GAPDH*	F:GGGGTCTACACTCCCAACTGC R:CAGAAGGCGGCGATGGAA	379	58

1.5.3　光镜观察

石蜡切片制作过程参照施恩青[10]推荐方法。瘤胃组织用冰冷的PBS冲洗干净后，取瘤胃腹囊底部约1 cm²。将所采集的组织迅速投入4%甲醛溶液中固定，以备制作组织切片和相关测定。石蜡包埋、切片、苏木精-伊红染色后，选择5张切片，每张切片选5个典型视野（组织完整），分别测量瘤胃背囊乳头长度和宽度，瘤胃肌层的厚度。采用Image-Pro Express 6.0图像分析系统软件测量瘤胃乳头宽度和长度。

1.5.4 瘤胃内挥发性脂肪酸的测定

使用气相色谱仪（AI 3000，德国Thermo公司）测定瘤胃液中挥发性脂肪酸含量。色谱柱为HP 19091N-213毛细管柱（Aglient）。色谱条件为: 进样口温度220 ℃，氮气流量2.0 mL/min，分流比40:1，程序升温模式（120 ℃ 3min，然后10 ℃/min至180 ℃，保持1 min），火焰氢离子检测器（FID）250 ℃，FID的空气、氢气和氮气流量分别为450、40和45 mL/min。

1.6　数据统计分析

实时定量PCR样品设置相同的阈线值，采用$2^{-\Delta\Delta CT}$方法处理数据[11]。数据分析利用SPSS 19.0统计分析软件进行两因子方差分析(two-way ANOVA,LSD)，差异显著时，采用Tukey's法进行多重比较，以P<0.05作为差异显著性判断标准。利用SPSS 19.0统计分析软件对数据（n=54）进行Pearson相关行分析，P<0.05为差异显著。

2　结　果

2.1　瘤胃乳头形态

由表4可知，断奶时间和羔羊日龄之间的交互作用和断奶时间对羔羊瘤胃乳头长度和肌

层厚度有显著影响（*P*＜0.05）。

28日龄断奶组羔羊瘤胃乳头长度和宽度显著高于56日龄断奶组羔羊（*P*＜0.05），但瘤胃肌层厚度显著低于56日龄断奶组羔羊（*P*＜0.05）。

日龄对羔羊瘤胃乳头长度和肌层厚度产生显著性影响（*P*＜0.05）。56、70 和 84 日龄羔羊瘤胃乳头长度显著高于 28 和 42 日龄羔羊（*P*＜0.05），42 日龄羔羊瘤胃乳头长度显著高于 28 日龄羔羊（*P*＜0.05）。56 和 70 日龄时，羔羊瘤胃肌层厚度显著高于 28、42 和 84 日龄羔羊（*P*＜0.05）。日龄对羔羊瘤胃乳头宽度无显著影响（*P*＞0.05）。

表 4　断奶时间对不同日龄湖羊羔羊瘤胃乳头形态的影响

Table 4　Effects of weaner time on morphological structure of rumen papillae of *Hu* lambs at different days of age

μm

项目 Items	日龄 Days of age	瘤胃乳头长度 Papilla height	瘤胃乳头宽度 Papilla width	肌层厚度 Muscular thickness
28 日龄断奶组 28 days of age weaner group	28	741.92^{d}	513.80	835.07^{d}
	42	$1\,280.04^{bc}$	664.28	844.41^{d}
	56	$1\,667.51^{ab}$	571.92	$1\,131.56^{ab}$
	70	$1\,908.78^{a}$	595.82	910.76^{cd}
	84	$1\,737.2^{ab}$	640.00	867.91^{d}
56 日龄断奶组 56 days of age weaner group	28	741.92^{d}	513.80	835.07^{d}
	42	$1\,035.51^{cd}$	508.89	849.62^{d}
	56	$1\,444.62^{b}$	448.48	$1\,080.36^{abc}$
	70	$1\,487.37^{b}$	500.79	$1\,170.70^{a}$
	84	$1\,605.07^{a}$	465.30	949.16^{bcd}
28 日龄断奶组 28 days of age weaner group		$1\,610.38^{a}$	618.01^{a}	937.81^{b}
56 日龄断奶组 56 days of age weaner group		$1\,435.34^{b}$	480.86^{b}	$1\,012.46^{a}$
28 日龄 28 days of age		741.92^{c}	513.80	835.07^{b}
42 日龄 42 days of age		$1\,157.77^{b}$	586.58	847.02^{b}
56 日龄 56 days of age		$1\,530.80^{a}$	510.20	$1\,105.96^{a}$
70 日龄 70 days of age		$1\,698.07^{a}$	548.31	$1\,040.73^{a}$
84 日龄 84 days of age		$1\,746.04^{a}$	552.65	906.84^{b}
SEM		33.64	13.29	18.50
P 值 *P*-value				
断奶时间 Weaner time		0.028	<0.001	0.032
日龄 Days of age		<0.001	0.177	<0.001
断奶时间×日龄 Weaner time×days of age		0.001	0.721	0.007

同一项目、同列数据肩标相同或无字母表示差异不显著(*P*>0.05)，不同小写字母表示差异显著(*P*<0.05)。下表同。

Values in the same column of the same item with the same or no letter superscripts mean no significant difference (*P*>0.05), and those with different lowercase letter superscripts differ significantly (*P*<0.05). The same as below.

2.2　断奶时间对湖羊羔羊表皮生长相关基因表达量的影响

由表5可知，断奶时间和羔羊日龄之间的交互作用对羔羊瘤胃上皮转化生长因子*β*（*TGFβ*）1、胰岛素样生长因子结合蛋白（*IGFBP*）3、*IGFBP*5和*IGFBP*6表达量产生了显著影响（*P*＜0.05）。

断奶时间对*IGFBP*3、*IGFBP*5和*IGFBP*6表达量有显著影响。28日龄断奶组羔羊瘤胃上皮*IGFBP*3、*IGFBP*5和*IGFBP*6表达量显著高于56日龄断奶组羔羊（*P*＜0.05）。其他差异不显著（*P*＞0.05）。

羔羊日龄对湖羊羔羊瘤胃上皮*TGFβ*1、*IGFBP*3和*IGFBP*5表达量有显著影响（*P*＜0.05）。42、70和84日龄羔羊瘤胃上皮*TGFβ*1表达量显著高于28和56日龄表达量（*P*＜0.05）。羔羊瘤胃上皮*IGFBP*3表达量，84日龄显著高于28、42和56日龄（*P*＜0.05）；56日龄显著高于28日龄（*P*＜0.05）。羔羊瘤胃上皮*IGFBP*5表达量，56日龄显著高于28、70和84日龄（*P*＜0.05）；70和84日龄日龄显著高于28日龄（*P*＜0.05）。羔羊日龄对瘤胃上皮*IGFBP*6表达量无显著性影响（*P*＞0.05）。

表 5　断奶时间对不同日龄湖羊羔羊瘤胃表皮生长相关基因表达量的影响

Table 5　Effects of weaner time on gene expressions involved inrumenepidermis growth of *Hu* lambs at different days of age

项目 Items	日龄 Days of age	转化生长因子 β1 *TGFβ*1	*IGFBP*3	*IGFBP*5	*IGFBP*6
28 日龄断奶组 28 days of age weaner group	28	1.93^{c}	5.21^{d}	10.33^{c}	5.59^{a}
	42	6.09^{ab}	11.10^{c}	23.35^{a}	3.75^{abc}
	56	2.05^{c}	28.34^{b}	22.37^{ab}	4.57^{ab}
	70	3.56^{bc}	28.37^{b}	11.61^{c}	2.08^{cd}
	84	5.46^{ab}	53.38^{a}	22.83^{b}	3.38^{bcd}
56 日龄断奶组 56 days of age weaner group	28	1.93^{c}	5.21^{d}	10.33^{c}	5.59^{a}
	42	4.47^{abc}	3.81^{d}	14.33^{c}	4.01^{abc}
	56	2.44^{c}	10.17^{c}	22.37^{ab}	3.18^{bcd}
	70	7.24^{a}	25.76^{b}	14.76^{bc}	4.17^{ab}
	84	4.32^{abc}	32.70^{b}	11.75^{c}	1.63^{d}
28 日龄断奶组 28 days of age weaner group		3.64	25.28^{a}	20.13^{a}	3.87^{a}
56 日龄断奶组 56 days of age weaner group		4.37	15.53^{b}	15.80^{b}	3.72^{b}
28 日龄 28 days of age		1.93^{b}	5.21^{d}	10.33^{d}	5.59
42 日龄 42 days of age		4.82^{a}	9.24^{cd}	18.84^{ab}	3.88
56 日龄 56 days of age		2.25^{b}	21.07^{bc}	22.37^{a}	3.88
70 日龄 70 days of age		4.90^{a}	31.45^{ab}	13.37^{c}	3.12

84 日龄 84 days of age	4.90[a]	38.11[a]	17.29[bc]	2.51
SEM	0.24	1.62	0.77	0.17
P 值 *P*-value				
断奶时间 Weaner time	0.247	<0.001	<0.001	0.005
日龄 Days of age	<0.001	<0.001	0.002	0.511
断奶时间×日龄 Weaner time×days of age	0.007	<0.001	0.001	<0.001

2.3 相关性分析

对试验 54 只羔羊瘤胃形态参数，短链脂肪酸（SCFA）和瘤胃上皮生长相关基因进行相关性分析。由表 6 可知，羔羊瘤胃液 SCFA 含量与瘤胃乳头长度、肌层厚度及瘤胃上皮 *TGFβ*1、*IGFBP*3 和 *IGFBP*5 表达量显著正相关（R=0.562，P<0.001；R=0.349，P<0.001；R=0.205，P=0.002；R=0.219，P=0.032；R=0.265，P=0.026），但与 *IGFBP*6 表达量显著负相关（R=-0.616，P<0.001）。丙酸含量与羔羊瘤胃乳头长度显著正相关（R=0.226，P=0.007）。丁酸含量与羔羊瘤胃乳头宽度和瘤胃上皮 *IGFBP*5 表达量显著正相关（R=0.216，P=0.009；R=0.316，P<0.001），与瘤胃上皮 *IGFBP*6 表达量显著负相关（R=-0.274，P=0.005）。

羔羊瘤胃乳头长度与瘤胃上皮 *TGFβ*1 和 *IGFBP*6 表达量呈显著负相关（R=-0.318，P=0.001；R=-0.520，P<0.001）。羔羊瘤胃乳头宽度与 *TGFβ*1 呈显著负相关（R=-0.275，P=0.004），与 *IGFBP*3 和 *IGFBP*5 呈显著正相关（R=0.344，P<0.001；R=0.256，P=0.001）。

表 6 瘤胃表皮生长相关基因与瘤胃形态和短链脂肪酸关联性分析

Table 6 Correlation between gene expressions involved in rumen epidermis growth and rumen morphology or muscular thickness (*n*=54)

项目 Items	短链脂肪酸 SCFA	乙酸 Acetate	丙酸 Propionate	丁酸 Butyrate	瘤胃乳头长度 Papilla height	瘤胃乳头宽度 Papilla width	肌层厚度 Muscular thickness	转化生长因子 β1 *TGFβ1*	胰岛素样生长因子结合蛋白 3 *IGFBP3*	胰岛素样生长因子结合蛋白 5 *IGFBP5*	胰岛素样生长因子结合蛋白 6 *IGFBP6*
短链脂肪酸 SCFA	1.000	-0.082	0.426*	-0.079	0.562*	0.036	0.349*	0.205*	0.219*	0.265*	-0.616*
乙酸 Acetate	-	1.000	-0.735*	-0.317*	-0.062	-0.106	-0.028	-0.213*	0.015	-0.144	0.005
丙酸 Propionate	-	-	1.000	-0.343*	0.226*	-0.024	0.073	-0.001	-0.111	-0.041	0.147
丁酸 Butyrate	-	-	-	1.000	0.100	0.216*	0.096	0.168	0.084	0.316*	-0.274*
瘤胃乳头长度 Papilla height	-	-	-	-	1.000	0.120	0.210*	-0.318*	-0.089	0.108	-0.520*
瘤胃乳头宽度 Papilla width	-	-	-	-	-	1.000	-0.091	-0.275*	0.344*	0.256*	0.076
肌层厚度 Muscular thickness	-	-	-	-	-	-	1.000	0.058	-0.027	0.041	-0.195
转化生长因子 β1 *TGFβ1*	-	-	-	-	-	-	-	1.000	0.477*	0.201*	-0.461*
胰岛素样生长因子结合蛋白 3 *IGFBP3*	-	-	-	-	-	-	-	-	1.000	0.143	-0.273*
胰岛素样生长因子结合蛋白 5 *IGFBP5*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.000	-0.103
胰岛素样生长因子结合蛋白 6 *IGFBP6*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.000

3 讨　论

生长因子超家族中的 TGFβ 控制包括细胞增殖、识别、分化和细胞凋亡等各种过程[12-13]，本试验中，羔羊瘤胃上皮 *TGFβ*1 表达量与瘤胃乳头长度和宽度呈显著负相关。有试验证明，*TGFβ*1 的下调能促进瘤胃发育[14]。TGFβ1 可能抑制羔羊瘤胃上皮细胞增殖和乳头状生长，Naeem 等[15]的试验也得到了相同的结果。

研究发现，胰岛素样生长因子（IGF）对瘤胃上皮细胞的促增殖作用主要受 IGFBP 家族的调控[16]。瘤胃内丁酸含量影响 *IGFBP* 调节 *IGF*1 在组织细胞中活动[17]。本试验羔羊瘤胃液丁酸含量与 *IGFBP*5 表达量呈显著正相关，丁酸可能会影响到 IGF 轴，促使其分泌促细胞分化的激素，减少促细胞凋亡激素的分泌[18]。本试验中 28 日龄断奶组羔羊瘤胃上皮 *IGFBP*5 表达量显著高于 56 日龄断奶组，Steele 等[19]试验证实，*IGFBP*5 表达量上调时促进瘤胃上皮细胞的增殖，从而促进了 28 日龄断奶组瘤胃乳头长度和宽度显著高于 56 日龄断奶组羔羊。这也与本试验中，*IGFBP*5 表达量与瘤胃乳头宽度呈显著正相关的结果一致。IGFBP6 结合 IGF2 优先于 IGF1，IGFBP6 具有抑制 IGF2 的功能。在本试验中，羔羊瘤胃上皮 *IGFBP*6 表达量与乳头长度和宽度呈显著负相关。这与之前 Bach 等[20]的试验中 IGFBP6 在瘤胃上皮具有抑制作用的结果一致。IGFBP3 抑制瘤胃组织细胞 IGF1 的活性，瘤胃内丁酸含量增加时，引起 *IGFBP*3 表达量下调[19,21]。但是，本试验中羔羊瘤胃乳头长度与瘤胃上皮 *IGFBP*3 表达量呈显著正相关，其原因还有待于进一步研究。

反刍动物瘤胃形态学研究中，瘤胃乳头长度是最重要的指标,其次是瘤胃乳头宽度和瘤胃壁厚度[22]。断奶前，小肠吸收是羔羊获得能量的主要来源。羔羊采食固体饲料时，瘤胃乳头开始增长，瘤胃黏膜开始加厚[23]。本试验 28~84 日龄 28 日龄断奶组羔羊日均干物质采食量（582.81 g/d）高于 56 日龄断奶组（552.97 g/d）。28 日龄断奶组羔羊瘤胃乳头长度和宽度显著高于 56 日龄断奶组羔羊，28 日龄断奶组瘤胃 SCFA 含量与瘤胃乳头长度呈正相关。这是因为羔羊断奶后，采食量增加，导致瘤胃内总挥发性脂肪酸含量增加，促进瘤胃发育[24]。Anderson 等[25]报道 28 日龄断奶犊牛瘤胃内丙酸和丁酸含量显著高于未断奶犊牛。本试验 28 日龄断奶组瘤胃丙酸含量与瘤胃乳头宽度和肌层厚度呈正相关。有研究表明，丙酸和丁酸是影响瘤胃乳头发育的重要因素[26-27]。此外，由于羔羊对固体饲料采食量增加，瘤胃物理性刺激增强，进一步促进瘤胃乳头的发育[28]。Žitňan 等[4]和 Stobo 等[29]试验也证明，犊牛早期断

奶可显著增加瘤胃乳头长度。新生反刍动物的瘤胃壁很薄,瘤网胃的容积很小。本试验结果表明，56 日龄断奶组羔羊瘤胃肌层厚度显著高于 28 日龄断奶组，Stobo 等[29]试验也证实，随着精料饲喂量的增加,羔羊瘤胃肌层厚度没有显著变化。但是，本试验羔羊日龄和断奶时间的交互作用对于羔羊瘤胃肌层厚有显著性的影响。Žitňan 等[4]研究发现，断奶后犊牛瘤胃乳头数量随着年龄的增长而降低。本试验中没有测量瘤胃乳头数量，早期断奶如何影响湖羊瘤胃乳头数量变化还有待于进一步的研究。

4 结 论

在本试验饲养管理模式下，28 日龄断奶能提高湖羊羔羊的开食料采食量，且促进瘤胃乳头发育。羔羊瘤胃内 SCFA 能促进瘤胃上皮 *IGFBP*3、*IGFBP*5 和 *IGFBP*6 表达，抑制 *TGFβ*1 表达；羔羊瘤胃上皮 *IGFBP*5 表达上调与瘤胃乳头发育呈显著正相关。

参考文献：

[1] LESMEISTER K E,HEINRICHS A J, GABLER M T.Effects of supplemental yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) culture on rumen development,growth characteristics,and blood parameters in neonatal dairy calves[J].Journal of Dairy Science,2004,87(6):1832–1839.

[2] RUSSELL J B,O’CONNOR J D,FOX D G,et al.A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: Ⅰ.Ruminal fermentation[J].Journal of Animal Science,1992,70(11):3551–3561.

[3] LESMEISTER K E,HEINRICHS A J.Effects of adding extra molasses to a texturized calf starter on rumen development,growth characteristics,and blood parameters in neonatal dairy calves[J].Journal of Dairy Science,2005,88(1):411–418.

[4] ŽITŇAN R,VOIGT J,WEGNER J,et al.Morphological and functional development of the rumen in the calf:influence of the time of weaning.1.Morphological development of rumen mucosa[J].Archiv für Tierernaehrung,1999,52(4):351–362.

[5] KLEIN R D,KINCAID R L,HODGSON A S,et al.Dietary fiber and early weaning on growth and rumen development of calves[J].Journal of Dairy Science,1987,70(10):2095–2104.

[6] 李述信,孟广政,于建国,等.AOAC 分析方法手册[M].14 版.北京:中国光学学会光谱专业委员会,1986.

[7] 张丽英.饲料分析及饲料质量检测技术[M].3 版.北京:中国农业大学出版社,2007.
[8] 中国饲料数据库.中国饲料成分及营养价值表(2013 年第 24 版)(续)[J].中国饲料,2013(22):38–42.
[9] 马志远,李飞,李发弟,等.早期断奶对湖羊羔羊生长性能及胃肠道发育的影响[J].动物营养学报,2015,27(5):1385–1393.
[10] 施恩青.改良与常规石蜡切片方法在切片质量方面的比较[J].齐齐哈尔医学院学报,2014,35(16):2442–2443.
[11] SCHMITTGEN T D,LIVAK K J.Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method[J].Nature Protocols,2008,3(6):1101–1108.
[12] SHI Y G,MASSAGUÉ J.Mechanisms of TGF-β signaling from cell membrane to the nucleus[J].Cell,2003,113(6):685–700.
[13] KRISHNAN K,ARNONE B,BUCHMAN A.Intestinal growth factors:potential use in the treatment of inflammatory bowel disease and their role in mucosal healing[J].Inflammatory Bowel Diseases,2011,17(1):410–422.
[14] CONNOR E E,BALDWIN Ⅵ R L,WALKER M P,et al.Transcriptional regulators transforming growth factor-β_1 and estrogen-related receptor-α identified as putative mediators of calf rumen epithelial tissue development and function during weaning[J].Journal of Dairy Science,2014,97(7):4193–4207.
[15] NAEEM A,DRACKLEY J K,LANIER J S,et al.Ruminal epithelium transcriptome dynamics in response to plane of nutrition and age in young Holstein calves[J].Functional & Integrative Genomics,2014,14(1):261–273.
[16] FIRTH S M,BAXTER R C.Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins[J].Endocrine Reviews,2002,23(6):824–854.
[17] SANDERSON I R.Short chain fatty acid regulation of signaling genes expressed by the intestinal epithelium[J].The Journal of Nutrition,2004,134(9):2450S-2454S.
[18] MALHI M,GUI H B,YAO L,et al.Increased papillae growth and enhanced short-chain fatty acid absorption in the rumen of goats are associated with transient increases in cyclin D_1

expression after ruminal butyrate infusion[J].Journal of Dairy Science,2013,96(12):7603–7616.

[19] STEELE M A,CROOM J,KAHLER M,et al.Bovine rumen epithelium undergoes rapid structural adaptations during grain-induced subacute ruminal acidosis[J].American Journal of Physiology Regulatory,Integrative and Comparative Physiology,2011,300(6):R1515–R1523.

[20] BACH L A.IGFBP-6 five years on; not so ‘forgotten’?[J].Growth Hormone & IGF Research,2005,15(3):185–192.

[21] STEELE M A,SCHIESTEL C,ALZAHAL O,et al.The periparturient period is associated with structural and transcriptomic adaptations of rumen papillae in dairy cattle[J].Journal of Dairy Science,2015,98(4):2583–2595

[22] LESMEISTER K E,TOZER P R,HEINRICHS A J.Development and analysis of a rumen tissue sampling procedure[J].Journal of Dairy Science,2004,87(5):1336–1344.

[23] GORKA P,KOWALSKI Z M,PIETRZAK P,et al.Effect of sodium butyrate supplementation in milk replacer and starter diet on rumen development in calves[J].Journal of Physiology and Pharmacology,2009,60(Suppl.3):47–53.

[24] REY M,ENJALBERT F, MONTEILS V.Establishment of ruminal enzyme activities and fermentation capacity in dairy calves from birth through weaning[J].Journal of Dairy Science,2012,95(3):1500–1512.

[25] ANDERSON K L,NAGARAJA T G,MORRILL J L.Ruminal metabolic development in calves weaned conventionally or early[J].Journal of Dairy Science,1987,70(5):1000–1005.

[26] SUÁREZ B J,VAN REENEN C G,STOCKHOFE N,et al.Effect of roughage source and roughage to concentrate ratio on animal performance and rumen development in veal calves[J].Journal of Dairy Science,2007,90(5):2390–2403.

[27] BEIRANVAND H,GHORBANI G R,KHORVASH M,et al.Forage and sugar in dairy calves' starter diet and their interaction on performance,weaning age and rumen fermentation[J].Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition,2014,98(3):439–445.

[28] NEMATI M,AMANLOU H,KHORVASH M,et al.Rumen fermentation,blood metabolites,and growth performance of calves during transition from liquid to solid feed:effects of

dietary level and particle size of alfalfa hay[J].Journal of Dairy Science,2015,98(10):7131–7141.

[29] STOBO I J,ROY J H,GASTON H J.Rumen development in the calf.1.The effect of diets containing different proportions of concentrates to hay on rumen development[J].The British Journal of Nutrition,1966,20(2):171–188.

Effects of Weaner Time on Rumen Morphology and Gene Expressions Involved in Rumen Epidermis Growth of *Hu* Lambs at Different Days of Age

LIU Ting[1] LI Fadi[1*] LI Chong[1,2] WANG Weimin[1,2] WANG Xiaojuan[1] LI Fei[3] ZHENG Chen[1] MO Futao[1] WANG Fangbin[1] LA Yongfu[1] LI Baosheng[4]

(1. *College of Animal Science and Technology, Gansu Agriculture University, Lanzhou* 730070, *China*; 2. *Engineering Laboratory of Sheep Breeding and Reproduction Biotechnology in Gansu Province, Minqin* 733300, *China*; 3. *College of Pastoral Agriculture Science and Technology, Lanzhou University, Lanzhou* 730020, *China*; 4. *Jinchang Zhongtian Sheep Industry Co. Ltd., Jinchang* 737100, *China*)

Abstract: The objective of this study was to investigate the effects of weaner time on rumen morphology and gene expressions involved in rumen epidermis growth of *Hu* lambs at different days of age. Two-factor design was used, and the factors were weaner time and days of age of lambs. A total of 54 *Hu* lambs with similar birth weight [（3.51±0.57） kg] were selected, and 6 of them were randomly selected and slaughtered on 28 days of age, while the remaining animals were randomly assigned to a 28 days of age weaner group [(8.21±0.97) kg] or a 56 days of age weaner group [(8.06±0.53) kg]. Six lambs from each group were randomly selected and slaughtered at 42, 56, 70 and 84 days of age, respectively. The ventral sac sample of rumen was collected to measure rumen papilla height, width and muscular thickness, and the tissue sample was extracted total RNA to measure gene expressions involved in rumen epidermis growth. The results showed as follows: rumen papilla height and thickness in 28 days of age weaner group was significantly higherthan that in 56 days of age weaner group (P<0.05), however, rumen muscular thickness in 28 days of age weaner group was significantly lower than that in 56 days of age

*Corresponding author, professor, E-mail: lifd@lzu.edu.cn （责任编辑 王智航）

weaner group ($P<0.05$). There were significant interactions of weaner time and days of age for rumen papilla height and muscular thickness ($P<0.05$). The expressions of insulin-like growth factor binding protein （*IGFBP*）3, *IGFBP*5 and *IGFBP*6 in 28 days of age weaner group were significantly higher compared to that in 56 days of age weaner group ($P<0.05$). Rumen papilla length was negatively correlated with expressions of *IGFBP*6 and transforming growth factor β （*TGFβ*）1 ($R=-0.318$， $P=0.001$； $R=-0.520$， $P<0.001$); rumen papilla width was negatively correlated with the expression of *TGFβ*1 ($R=-0.275$， $P=0.004$), while were positively correlated with expressions of *IGFBP*3 and *IGFBP*5 ($R=0.344$， $P<0.001$； $R=0.256$， $P=0.001$). In conclusion, the results indicates that weaning at 28 days of age can promote rumen papillae development, affect expressions of genes involved in rumen epidermis growth, and may modulate early development of rumen of *Hu* lambs.

Key words: *Hu* lamb; early weaning; rumen morphology; development; gene expression